

巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu62 的质粒及 *nifHDK* 基因的定位*

何路红 李季伦

(北京农业大学生物学院,北京)

对从北京郊区玉米根际分离到的巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu62 的质粒进行了分离和检测,发现检测方法不同,得到的质粒数目也不同,用 Kado 法只发现一个大质粒,以 pABm 1 表示,其分子量约为 120 Md; 而用改良的 Eckhardt 方法,则发现有 5 个大质粒,分别以 pABm 1、pABm 2、pABm 3、pABm 4 和 pABm 5 表示,它们的分子量分别约为 120 Md、330 Md、360 Md、480 Md 和 900 Md, 都是巨型质粒,用多种方法检测均未发现小质粒。

应用生物素标记的核酸杂交技术制备了 Biotin-*nifHDK* 探针,并对 Yu62 菌株的质粒及染色体片段进行了 Southern 印迹杂交和斑点杂交,杂交结果表明 *nifHDK* 基因定位于染色体上。

关键词 巴西固氮螺菌;质粒;*nifHDK* 基因

固氮螺菌 (*Azospirillum*) 是一种新型的生物固氮资源,它不仅能与多种重要的禾本科作物如小麦、玉米、水稻、高粱和甘蔗等根部联合共生,而且适应性强、分布广泛,因而具有较高的应用前景。自七十年代以来,各地开展了固氮螺菌的田间接种试验,但增产效果不一,一般在贫瘠的土壤中效果较好,而在稍肥沃的土壤中则无明显效益^[1]。这是因为环境中高浓度的铵会抑制该菌的固氮作用,高铵不但阻遏该菌固氮酶的合成,同时还抑制已合成的固氮酶的活性^[2],因此大大限制了固氮螺菌的实际应用。只有对该菌进行遗传改造,获得解除铵对其固氮作用抑制的“抗铵工程菌株”,才能充分发挥其应用潜能。了解该菌固氮基因 (*nif*) 的定位、排列、结构及其表达调控机制等有关分子遗传学规律,则是该项工作的理论基础。

近年来,固氮螺菌的分子遗传学研究

进展较快,已构建了固氮螺菌的基因文库,并克隆了其 *nifHDK*、*glnA* 和 *draT/draG* 等基因,对其固氮作用的调控机制也有了初步了解^[3,4]。但是,该菌的 *nif* 基因定位至今尚未得到一致的结论。现已发现,多数固氮螺菌菌株都有质粒,其大小和数目因菌株不同而异,一般为 1—6 个,分子量为 4—370Md^[5]。Singh 等人发现在巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 和产脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*) 中有 500—600 Md 的巨大质粒^[5]。Wood 等人发现在巴西固氮螺菌 125A2 菌株中有 42—1850 Md 七个大质粒存在^[6]。Lemos 和 Uozumi 等人分别用质粒消除法研究了固氮螺菌质粒与固氮作用的关系,认为固氮螺菌的质粒参与固氮作用^[7]。但是,Planzinski 等人用 ³²P-*nifHDK* 作探针进

本文于 1990 年 2 月 21 日。

* 国家自然科学基金重点资助项目。

行分子杂交表明质粒并不携带 *nifHDK* 基因, 即 *nifHDK* 基因定位于染色体上^[7]。Singh 等人用同样的方法研究了小于 300 Md 的质粒与 *nifHDK* 基因的关系, 结果也表明质粒不带 *nifHDK* 基因^[8], 但他们并未排除更大的质粒参与固氮作用的可能性。由于分离、检测巨型质粒非常困难, 迄今为止, 这一问题一直没有明确的结论, 对巨型质粒的功能也了解甚少。

我国早在 70 年代末就开展了固氮螺菌的研究工作^[9], 但对其质粒及其与 *nif* 基因关系的研究尚未见报道。本文选用从北京郊区玉米根际分离到的我国土著固氮螺菌 Yu 62 为材料, 研究了检测该菌株质粒的方法, 并应用生物素标记的核酸杂交技术探明了该菌株 *nifHDK* 基因定位于染色体上, 而与质粒无关。

材料和方法

(一) 质粒、菌株及其培养条件

供试巴西固氮螺菌 Yu 62 菌株为本研究室提供^[10]; 标准菌株巴西固氮螺菌 Sp 7 为李久蒂赠送, 该菌株有 4 个大质粒, 其分子量分别为 100、130、350、370Md^[7], 在本文中用作分子量标记; 质粒 pSA 30 含有肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的 *nifHDK* 基因^[9], 其寄主菌是大肠杆菌 (*E. coli*) HB 101, 由 Kennedy 赠送。三种菌株都用 LB^[10] 培养液培养, 条件是固氮螺菌: 30℃, 20 小时; *E. coli*: 37℃, 16 小时。所有菌株都振荡培养, 转速为 200 r/min。

(二) 巴西固氮螺菌 DNA 操作

1. 质粒的检测: (1) 采用 Kado 法^[11]; (2) 采用改良的 Eckhardt 法^[12, 13]。水平板胶的制作及电泳条件参照文献[13]。样品处理方法有两点改进; (a) 溶菌前用 TBE 洗涤细胞 (TBE 为 89 mmol/L Tris, 89

mmol/L 硼酸, 2 mmol/L EDTA, pH8.3), 并置于 4℃ 冷冻 20 分钟; (b) 将溶菌悬液中的蔗糖改为聚蔗糖 Ficoll 400, 或改成低熔点琼脂糖 (65℃ 融化, 冷却至 40℃ 左右时, 加入溶菌酶、RNase, 混匀后与菌细胞混合, 迅速加样)。

2. 质粒及染色体片段的回收: 参照 Thuring^[14] 的方法加以改进。将经水平板凝胶电泳分离的质粒及染色体片段胶条切下, 分别装入无菌的 Eppendorf 离心管中, 待数次电泳分离到的凝胶条足够多时, 将同样片段的胶条用 Parafilm 包在一起, 于液氮气相中冷冻 5 分钟, 迅速挤压冷冻胶条, 挤出液体吸入无菌 Eppendorf 管中, 离心去掉残留的琼脂糖颗粒, 贮于 4℃ 备用。

3. 总 DNA 的提取: 参照 Robert^[15] 的方法。

(三) Biotin-*nifHDK* 探针的制备

质粒 pSA 30 的提取、纯化、EcoRI 酶切及 *nifHDK* (6.2 kb 的 EcoRI 片段) 的回收均参照 Maniatis^[10] 的方法进行。*nifHDK* 与 Biotin-7-dATP 经缺刻平移法制成 Biotin-*nifHDK* 探针, 探针标记情况及浓度经 ABAP (Avidin-Biotinylated calf intestinal alkaline phosphatase) 染色法染色, 然后与标准 Biotin-λ DNA 染色斑点目测比色后确定。具体操作按 Bethesda Research Laboratories) 产品说明书进行。

(四) Southern 印迹杂交

电泳胶板经短波 (2537nm) 紫外灯照射 15 分钟后, 再用 0.25 mmol/L HCl 浸泡 7 分钟, 然后进行碱变性、中和, 经 Southern 吸印到硝酸纤维素膜上, 烤干后用甲酰胺体系预杂交 4 小时, 与 Biotin-*nifHDK* 探针杂交 20 小时^[16], 然后经 ABAP 染色, 据染色斑点确定杂交结果^[16]。

(五) 斑点杂交

将冷冻挤压法回收的巨型质粒及染色体片段 DNA 分别点到硝酸纤维素膜上, 经碱变性和中和后^[17], 同(四)一样进行预杂交、杂交和染色。

(六) 质粒分子量的估算

据 Hynes^[18] 等人提出的公式 $\text{Log}L$ (分子量) = $K \cdot 1/M$ (M : 质粒的电泳迁移率), K 为比例系数, 由已知质粒的分子量(L)和电泳迁移距离(M)代入公式求得, 将未知质粒的电泳迁移距离代入公式, 即可计算出未知质粒的分子量。

结果和讨论

(一) Yu62 菌株质粒的检测及其分子量的估算

鉴于已报道的固氮螺菌质粒分子量范围为 4—1800Md, 我们分别采用了适用于大质粒和小质粒的检测方法。结果发现, 目前普遍采用的 Kado 法能简便、有效地检测标准菌株 Sp 7 的两个质粒 pABSp 7c (130Md) 和 pABSp 7d (100 Md)^[7], 以及质粒 pSA30 (6.3 Md), 用于检测 Yu62 菌株时, 发现该菌株有一个质粒, 命名为 pABm 1, 其电泳迁移率介于 pABSp 7c 和 pABSp 7d 之间, 据公式 $\text{Log} L = K \cdot 1/M$ (见上述) 估算, pABm 1 的分子量为 120 Md; 该菌株不含小质粒。质粒的电泳图谱见图 1。

反复试验证明, Kado 法不能有效地检测到 Sp 7 菌株的两个巨型质粒 (pABSp 7a: 350 Md 和 pABSp 7b: 370 Md), 表明 Yu 62 菌株也可能不止一个质粒。我们用改良的 Eckhardt 胶内温和裂解法, 发现 Yu62 菌株含有 5 个质粒(图 2), 分别称为 pABm 1、pABm 2、pABm 3、pABm 4 和 pABm 5, 同上估算它们的分子量分别是 120、330、360、480 和 900Md。

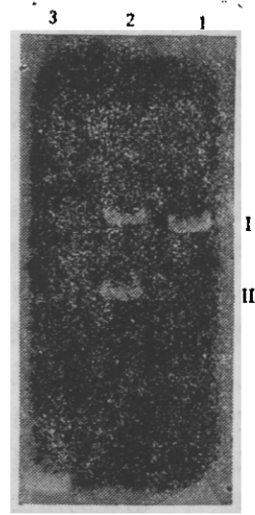


图 1 Kado 法检测巴西固氮螺菌 Yu62 质粒

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *Azospirillum brasilense* Yu62 plasmid DNAs extracted by Kado's procedure

1. *A. brasilense* Yu62 (I: pABm1);
2. *A. brasilense* Sp7 (I: pABSp7d; II: pABSp7c);
3. pSA30; 1 and 3 as the markers of plasmid

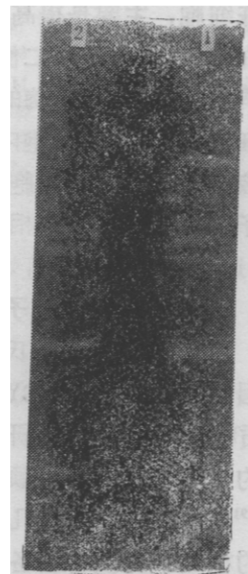


图 2 水平板胶内裂解法检测 Yu62 质粒

Fig. 2 Horizontal gel electrophoresis of *Azospirillum brasilense* Yu62 DNA lysates by Eckhardt's method

- 1: *A. brasilense* Yu62 (harboring five plasmids);
- 2: *A. brasilense* Sp7 (Harboring four plasmids)

由于 pABm 4 和 pABM 5 的分子量超出已知质粒范围,数值可能有偏差。

我们认为图 2 呈现的 5 条带是 5 个质粒,而不是其中较小质粒的开环形式或线状形式。因为溶菌和质粒分离等一系列操作都是在凝胶电泳中进行的,作用条件温和,最大限度地避免了对大质粒的剪切,特别是在溶菌悬浮液中改用聚蔗糖(增加粘度)或低熔点琼脂糖(固化细胞)后,水溶液对大质粒的机械剪切力降到最低,提高了大质粒的稳定性,因此不可能出现开环形式或线状形式。同时,作为对照的标准菌株 Sp7 在同样条件下出现的质粒数目与文献报道相同^[7],也说明上述论点正确。此外,由于染色体 DNA 的分子量更大,一般不能进入胶内,而是滞留在样井中,被切割成片段的染色体 DNA 则呈拖尾形式出现在胶中(图 2)。

在进行巨型质粒检测时,增加 TBE 洗涤和 4℃ 冷冻细胞,主要是提高了溶菌效果,TBE 中的 EDTA 能整合二价阳离子,使细胞壁结构松散,便于溶菌酶的作用,冻融则有利于细胞裂解,释放细胞内含物;增加溶菌悬浮液的粘度或固化细胞则与新近发展的大分子 DNA 操作原理相吻合。试验结果表明,这些改进措施是有效的。

(二) 与 nifHDK 基因分子杂交

Cannon 等人将肺炎克氏杆菌的 nifHDK 基因克隆到质粒 pACYC 184 载体上,得到质粒 pSA 30^[9]。已研究过的所有固氮菌株的 nifHDK DNA 顺序都有很高的保守性^[19],本文采用最近几年发展的生物素标记的核酸杂交技术制备了 Biotin-nifHDK 探针,并对检测到的 Yu62 菌株的质粒及染色体片段 DNA 进行了 Southern 印迹杂交,结果见图 3。

Biotin-nifHDK 与质粒无杂交带形成,而与染色体片段 DNA 有杂交形成,这

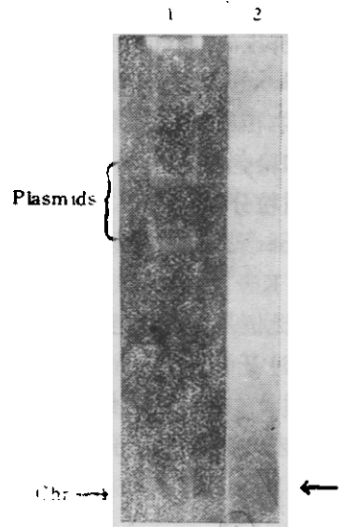


图 3 Southern 印迹杂交结果

Fig. 3 Southern hybridization of *Azospirillum brasilense*

1: Plasmid pattern of Yu62

2: The result of A after southern hybridization with Biotin-nifHDK; Chr: Chromosome DNA fragments

说明 nifHDK 定位于染色体上,而与质粒无关。

考虑到 Yu62 菌株的质粒太大, Southern 转印的效果可能欠佳,我们将多次电泳分离到的质粒及染色体片段分别回

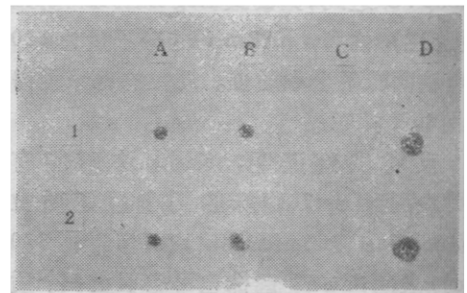


图 4 点杂交结果

Fig. 4 The result of Dot-blot of *Azospirillum brasilense* Yu62 with Biotin-nifHDK

A: Total DNA; B: Chromosome DNA fragments; C-1: pABm1; C-2: pABm2; pABm3; pABm4 and pABm5; D-1: Biotin-nifHDK; D-2: pSA30

收,然后点到硝酸纤维素膜上,再用 Biotin-nifHDK 探针杂交(点杂交),结果(图4)表明 nifHDK 定位于染色体上,而与质粒无关,这与 Southern 印迹杂交的结果是一致的。点杂交试验避免了大分子 DNA 转印不好的缺陷,因此结论是可靠的。

Southern 印迹杂交和点杂交的结果都表明,巴西固氮螺菌 Yu62 的质粒不携带 nifHDK 基因,这一结果与 Singh 和 Planzinski 等人用 ^{32}P -nifHDK 杂交的结果是一致的,他们都发现固氮螺菌的质粒未携带 nifHDK 基因^[5,7]。这一结论与 Lemos 和 Uozumi 等人的结论也并不矛盾,他们认为,固氮螺菌的质粒参与固氮作用,并不表明质粒一定携带 nifHDK 基因。有关这些质粒的功能及其与固氮作用的关系尚待研究。

参 考 文 献

- [1] Pedrosa, F. O.: *CRC Critical Reviews in Plant Science*, 6: 4, 363, 1988.
- [2] Subba Rao, N. S.: *Associative Nitrogen Fixation* (Ed. Vose, P. B. and Ruschel, A. P.), 1: 137, CRC Press, Boca Raton, Fla, 1981.
- [3] Pedrosa, F. O. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 23: 95, 1984.
- [4] Fu, H. A. et al.: *Nitrogen Fixation: Hundred Years After* (Ed. Bothe/de Bruijn/Newton), p. 336, Gustav Fischer Stuttgart New York, 1988.
- [5] Singh, M. et al.: *Abstracts of Fourteenth Steenhook Symposium Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism*, p. 132, (Ed. Univ. of Wisconsin-Madison) 1984.
- [6] Wood, A. G. et al.: *Azospirillum I* (Ed. Klingmuller, W), p. 18, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1982.
- [7] Planzinski, J. et al.: *J. Bacteriol.*, 155: 1429, 1983.
- [8] 杨洁彬等: 北京农业大学学报, 10: 321-329, 1984.
- [9] Cannon, F. C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 174: 59-66, 1979.
- [10] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, 1982.
- [11] Kado, C. I. et al.: *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373, 1981.
- [12] Eckhardt, T.: *Plasmid*, 1: 584-588, 1978.
- [13] 王常霖等: 遗传学报, 15: 25-33, 1988.
- [14] Thuring, R. W. et al.: *Anal. Biochem.*, 66: 213, 1975.
- [15] Robert, R. L. et al.: *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1983.
- [16] Leary, J. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4045-4049, 1983.
- [17] 吴冠芸等: 基因诊断, p. 177, 人民卫生出版社, 北京, 1988.
- [18] Hynes, M. F. et al.: *Arch. Microbiol.*, 150: 326-332, 1988.
- [19] Ruvkun, G. B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 191-195, 1980.

PLASMIDS IDENTIFICATION AND *nifHDK* GENE LOCATION IN *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Yu62

He Luhong Li Jilun

(College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing)

Azospirillum brasilense Yu62 is an associative nitrogen fixation bacteria which was isolated from the rhizosphere of maize grown in the suburb field of Beijing. Five plasmids have been found in Yu62 and the molecular weight of them is 120, 330, 360, 480, and 900 Md, respectively. Various procedures for isolating plasmid gave out different number of plasmid: with Kado's Method, only 120 Md plasmid could be detected; with the improvement of Eckhardt's method, all five plasmids could be identified. In addition, this strain

does not harbor small plasmid.

Analysis with the Biotin-*nifHDK* probe by Southern hybridization and Dot hybridization showed that the *nifHDK* gene of this strain was not located on the plasmids but on the chromosome.

Key words

Azospirillum brasilense Yu62; Plasmids;
nifHDK